

PCT/JP 03/10303

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

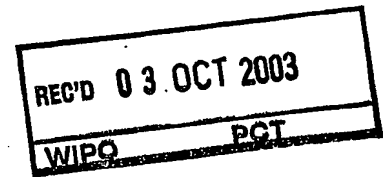
13.08.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2002年 8月16日

出願番号  
Application Number: 特願2002-237610  
[ST. 10/C] :- [JP 2002-237610]



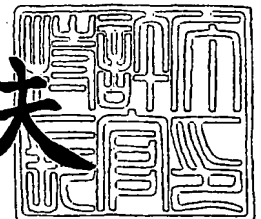
出願人  
Applicant(s): 科学技術振興事業団  
国立感染症研究所長

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月19日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 NP01538-YS

【提出日】 平成14年 8月16日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 1/21

【発明の名称】 組換え B C G ワクチン

【請求項の数】 2

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都三鷹市下連雀 2-5-11

    【氏名】 本多 三男

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市多摩区中野島  
                        6-29-3-403

    【氏名】 松尾 和浩

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都中野区中央 3-25-12

    【氏名】 兼清 優

【特許出願人】

    【識別番号】 396020800

    【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【特許出願人】

    【識別番号】 591222245

    【氏名又は名称】 国立感染症研究所長

【代理人】

    【識別番号】 100093230

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 西澤 利夫

    【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013341

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 組換えBCGワクチン

【特許請求の範囲】

【請求項1】 外来性の抗原性タンパク質をコードするポリヌクレオチドを保有する発現ベクターによって形質転換された組換えBCGワクチンであって、ポリヌクレオチドが、各コドンの第3番目塩基がアミノ酸の種類を変化させることなくGまたはCに置換された改変型ポリヌクレオチドである組換えBCGワクチン。

【請求項2】 改変型ポリヌクレオチドの各コドンの全塩基が、アミノ酸の種類を変化させることなくGまたはCを多く含むように置換されている請求項1の組換えBCGワクチン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、組換えBCGワクチンに関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、少ない用量で外来性抗原タンパク質に対する十分な免疫応答を誘導することのできる組換えBCGワクチンに関するものである。

【0002】

【従来の技術】

牛型結核菌弱毒BCG株 (Mycobacterium bovis BCG。以下「BCG」と記載する) は、その安全性から、最も一般的な生バクテリアワクチンとして知られている。

【0003】

一方、この十数年来の遺伝子組換え技術の開発、向上に伴い、ウイルスや細菌などの微生物に外来性の抗原性タンパク質を発現させるように改変して、様々な感染症や癌の予防および治療に対するワクチンベクターとして応用しようという研究が盛んに行われて来ている。BCGについても、例えばヒト免疫不全ウイルス (HIV) やサル免疫不全ウイルス (SIV) を標的とする組換えBCGワクチンが報告されている (J. Immunol. 164:4968-4978, 2000; J. Virol. 71:2303-2309, 1997; Infect. Immun. 57:283-288, 1989)。

【0004】

## 【発明が解決しようとする課題】

BCG株は、その安全性と供給が容易であるという点において優れた組換えワクチンの候補である。

## 【0005】

しかしながら、従来の組換えBCGワクチンの場合には、標的となる感染症や癌等に対する免疫誘導能の点においては必ずしも十分なものではなかった。例えば、HIV-1を標的とする組換えBCGワクチンを用いてモルモットに免疫誘導を行った場合には、通常のBCGワクチンのヒトへの使用量（0.05-0.1mg）の50～100倍の量を投与する必要がある（Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:10698-10697, 1995）。

## 【0006】

一方、組換えワクチンにおいて、外来抗原タンパク質に高い免疫原性を与える手段として、コドンの最適化が試みられている。すなわち、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) のリステリオリシン (listeriolysin) O (J. Immunol. 161 : 5594-5599, 1998)、HIV-1 Gag (J. Virol. 75 : 10991-11001, 200; J. Virol. 74 : 2628-2635, 2000)、Env (J. Virol. 72 : 1497-1503, 1998)、破傷風毒素 (Vaccine 19 : 810-815, 2000)、ヒトパピローマウイルスのL1タンパク質 (J. Virol. 75 : 9201-9209, 2001)、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) のメロゾイト表面タンパク質 1 (Infect. Immun. 69 : 7250-7253, 2001) などのコドン最適化が報告されている。しかしながら、これらのコドン最適化は、各抗原タンパク質のアミノ酸コドンをヒト化したものである。また、組換えワクチンもDNAワクチン (naked DNA) であり、BCG株等の他の組換えベクターを主成分とするワクチンにおいては、コドン最適化の効果は全く報告されていない。

## 【0007】

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、抗原性タンパク質の発現量に優れ、その結果として通常のBCGワクチンと同程度の使用量によっても、標的とする感染症や癌等に対して十分な免疫応答を誘導することのできる組換えBCGワクチンを提供することを課題としている。

## 【0008】

## 【課題を解決するための手段】

この出願の発明は、前記の課題を解決するための発明として、外来性の抗原性タンパク質をコードするポリヌクレオチドを保有する発現ベクターによって形質転換された組換えBCGワクチンであって、ポリヌクレオチドが、各コドンの第3番目塩基がアミノ酸の種類を変化させることなくGまたはCに置換された改変型ポリヌクレオチドである組換えBCGワクチンを提供する。

## 【0009】

この組換えBCGワクチンにおいては、改変型ポリヌクレオチドの各コドンの全塩基が、アミノ酸の種類を変化させることなくGまたはCを多く含むように置換されていることを好ましい態様の一つとしている。

## 【0010】

以下、発明の実施形態を示し、この出願の組換えBCGワクチンについてさらに詳細かつ具体的に説明する。

## 【0011】

## 【発明の実施の形態】

この発明の組換えBCGワクチンは、外来性の抗原性タンパク質をコードするポリヌクレオチドを保有する発現ベクターによって形質転換された組換えBCGを有効成分とする。そして、外来性の抗原性タンパク質をコードするポリヌクレオチドが、コードする抗原性タンパク質のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基の種類を変化させないという条件で、各アミノ酸残基をコードするコドンの第3番目塩基がG（グアニン）またはC（シトシン）に置換された改変型ポリヌクレオチドであることを特徴としている。

## 【0012】

コドンの置換は、具体的には表1に示したとおりである（「至適コドン」の欄）。すなわち、例えばグリシン（Gly）をコードするコドンは、GGT、GGC、GGAおよびGGGの4種類であるが、上記の基準に合致するGlyコドンはGGCまたはGGGである。従って、任意の抗原性タンパク質のアミノ酸配列におけるGlyコドンがGGTまたはGGAである場合には、第3番目のT（チミン）またはA（アデニン）は、Cまた

はGに置換される。

【0013】

【表1】

アミノ酸			コドン	至適コドン
グリシン	Gly	G	GGT, GGC, GGA, GGG	<b>GGC, GGG</b>
アラニン	Ala	A	GCT, GCC, GCA, GCG	<b>GCC, GCG</b>
バリン	Val	V	GTT, GTC, GTA, GTG	<b>GTC, GTG</b>
ロイシン	Leu	L	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG	<b>CTC, CTG, TTG</b>
イソロイシン	Ile	I	ATT, ATC, ATA	<b>ATC</b>
セリン	Ser	S	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC	<b>TCC, TCG, AGC</b>
スレオニン	Thr	T	ACT, ACC, ACA, ACG	<b>ACC, ACG</b>
システイン	Cys	C	TGT, TGC	<b>TGC</b>
メチオニン	Met	M	ATG	<b>ATG</b>
アスパラギン	Asn	N	AAT, AAC	<b>AAC</b>
グルタミン	Gln	Q	CAA, CAG	<b>CAG</b>
フェニルアラニン	Phe	F	TTT, TTC	<b>TTC</b>
チロシン	Tyr	Y	TAT, TAC	<b>TAC</b>
トリプトファン	Trp	W	TGG	<b>TGG</b>
アスパラギン酸	Asp	D	GAT, GAC	<b>GAC</b>
グルタミン酸	Glu	E	GAA, GAG	<b>GAG</b>
ヒスチジン	His	H	CAT, CAC	<b>CAC</b>
リジン	Lys	K	AAA, AAG	<b>AAG</b>
アルギニン	Arg	R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	<b>CGC, CGG, AGG</b>
プロリン	Pro	P	CCT, CCC, CCA, CCG	<b>CCC, CCG</b>

【0014】

この発明においては、各コドンの全ての塩基はさらに、それがコードするアミノ酸残基の種類を変化させない条件で、GまたはCを多く含むように置換されていることを好ましい態様としている。このような置換は、具体的には、ロイシン (Leu) およびアルギニン (Arg) に適用される。すなわち、表1に示した至適コドンのうち、Leuコドンとしては、Tを2個含むコドン (TTG) よりも、CTCまたはCT

Gが好ましく選択される。また、Argコドンとしては、Aを含むコドン (AGG) よりも、CGCまたはCGGが好ましく選択される。

#### 【0015】

以上のとおりのコドン置換は、以下の知見に基づいている。すなわち、BCGゲノムはG+C含量の高いDNAから成り、コドンの3番目の位置はGCペアを強く好むことが知られている (J. Virol. 75:9201-9209, 2001; Infect. Immun. 57:283-288, 1989)。また、BCG遺伝子についての集積された情報 (Nucl. Acids Res. 28:292, 2000) から、ArgのAGAコドンおよびLeuのTTAコドンの使用頻度は極めて低いこと (全コドンの0.9%および1.6%) も知られている。一方、例えば、HIV-1はコドンの3番目の位置にATペアを好むことが知られている。すなわち、HIV-1 p24遺伝子のコード配列においては、11個のArgコドンのうち9個がAGAを用い、また18個のLeuコドンのうち6個がTTAを用いている。コドン使用頻度の好みは、単細胞生物では対応するアミノアシルtRNA量と相関関係があることが一般的に知られている (Nature 325:728-730, 1987; Mol. Biol. Evol. 2:13-34, 1985) が、HIV-1 p24遺伝子において好まれるArgコドン (AGA) およびLeuコドン (TTA) 用のアミノアシルtRNA量はBCG細胞においては極めて低いと考えられる。

#### 【0016】

従って、この発明においては、BCG細胞において特に好まれるコドン使用頻度 (すなわち、コドンの第3番目塩基がGまたはC、さらにはGまたはCをできるだけ多く含むコドン) に合致した塩基配列となるように、外来性の抗原性ポリヌクレオチドを置換するようにしている。

#### 【0017】

各コドンに対応した好ましい塩基置換をポリヌクレオチドに導入するには、公知のKunkel法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488, 1985およびMethods in Enzymology 154:367, 1987) や、ミューテーション・キット等を使用する方法、あるいは変異導入型のPCR法などを採用することができる。

#### 【0018】

BCG株は、結核の予防接種等に使用されている公知のものを対象とすることができる。また、BCG株に導入する発現ベクターは、従来の組換えBCGワクチンの作



成に使用されているような、BCG用ベクター（例えばプラスミドpS0246等）を使用することができる。このベクターのクローニングサイトに、外来性（すなわち、BCG以外）の任意の抗原性タンパク質をコードするポリヌクレオチドを挿入することによって発現ベクターを構築することができる。なお、以下の記載では、外来性の抗原性タンパク質を「外来ポリペプチド」、これをコードするポリヌクレオチドを「外来ポリヌクレオチド」と記載することがある。また、外来ポリヌクレオチドには、BCG株由来の任意のプロモーターおよびターミネーター配列（例えばBCG株由来のヒートショックタンパク質Hspのプロモーターおよびターミネーター配列）等を連結することによって、外来ポリペプチドを良好に発現させるようにする。

#### 【0019】

外来ポリヌクレオチドは、BCG株以外の抗原性タンパク質をコードするポリヌクレオチド（例えば、cDNA断片）であり、外来ポリペプチドは生体内で抗原抗体反応を惹起するものであれば如何なるものであってもよい。具体的にはヒト後天性免疫不全症候群（AIDS）の原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス（HIV）のgag前駆体p55またはp24タンパク質、envタンパク質gp120またはgp160、pol前駆体タンパク質、nefタンパク質、tatタンパク質等を対象とすることができる。また、サル免疫不全ウイルス（SIV）由来の同様の抗原性ポリペプチドを使用することもできる。あるいは、その他の病原体（他の病原性ウイルスや細菌）、もしくは癌細胞の抗原タンパク質をコードするポリヌクレオチド等を用いることもできる。

#### 【0020】

外来ポリヌクレオチドの取得方法としては、外来ポリペプチドをコードするゲノム遺伝子またはそのcDNAがクローン化されたプラスミドからその実質的な配列であるポリヌクレオチドを適当な制限酵素で切り出すか、適当な配列のプライマーを用いたpolymerase chain reaction (PCR) により増幅すればよい。クローン化されていない場合は、その遺伝子を持つ細菌、動物のゲノムDNAを、ウイルスの場合はウイルスが感染した動物細胞由来のDNAまたはRNAを鋳型として、上記PCR法によりDNA断片を増幅することにより得ることができる。

## 【0021】

このようにして構築した発現ベクターを、塩化カルシウム法や電気穿孔法等の公知に方法でBCG株に導入し、形質転換菌の外来ポリペプチドの発現をウェスタンブロットや公知の免疫測定法（例えばELISA法等）によって確認することによって、この発明の組換えBCGを作成することができる。

## 【0022】

このようにして作成した組換えBCGを、通常のBCGワクチンと同様の液状担体に懸濁することによって、組換えBCGワクチンを作成することができる。

## 【0023】

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

## 【0024】

## 【実施例】

## 1. 材料および方法

## 1.1. 試薬

組換えDNAのための全ての酵素および大腸菌HB101コンピテント細胞は、Takara Shuzo Co. Ltd. (日本) より購入した。野性型HIV-1 p24遺伝子増幅用のプライマーは、ESPEC Oligo Service Co. Ltd. (筑波、日本) から入手した。抗HIV-1 Gag p24モノクローナル抗体V10は、Dr. Ikuta (大阪大学) より提供された。ウェスタン免疫ブロット分析のためのペルオキシダーゼ結合抗マウスIgGは、Bio-Rad Co. Ltd. より購入した。

## 1.2. 細菌株および培地

遺伝子操作は、大腸菌HB101コンピテント細胞を用いて行った。マイコバクテリア株は、BCG Tokyoワクチン株を使用した。組換えBCG (rBCG) の培養のための培地は、アルブミンデキストロース複合体を含むMiddlebrook 7H9ブロス (7H9-ADC) (Difco. Co) を使用した。

## 1.3. p24発現ベクターの構築およびBCGの形質転換

BCGのhsp60遺伝子をコードするDNAフラグメント (Infect. Immun. 55:1466-75, 1987) を、pUC18のSmaI-SalI部位へクローニングした (pUC-hsp60)。マルチ

クローニングサイトおよびhsp60遺伝子のターミネーター領域に相当する合成DNAフラグメントをpUC-hsp60のMunI-KpnI部位にクローニングし、次いでEcoRI部位にKpnIリンカーを挿入し、pUC-hspKベクターを構築した。サブタイプBウイルスのgag p24遺伝子は、pNL432プラスミド (J. Virol. 59:284-291, 1986) からPCR増幅した。PCRプライマーは以下を使用した。

【0025】

フォワード: AATGGATCCTATAGTGCAGAACCTC (配列番号1: 下線はBamHI部位)

リバーズ: AATGGGCCCTTACAAACTCTTGCTTTATGG (配列番号2: 下線はApaI部位)

このPCR産物を、pUC-hspKのBamHI-ApaI部位に翻訳枠を一致させてクローニングし、pUC-hspK-p24WTを構築した。

【0026】

一方、p24遺伝子の全塩基配列が、BCGにおける至適コドン (表1参照) となるように、公知の合成法を用いて合成DNA断片を作成した (図1、配列番号3)。この合成DNA断片 (改変型p24遺伝子) をpUC-hspKベクターの前記と同一部位にクローニングし、pUC-hspK-p24Muを合成した。

【0027】

これらの組換えベクターをKpnIによって消化し、p24発現ユニットを含む小フラグメントを、安定な大腸菌-マイコバクテリアシャトルベクターpS0246 (FEMS Microbiol. Lett. 135:237-243, 1996) のKpnI部位にサブクローニングし、発現ベクターpS0-p24WTおよびpS0-p24Muをそれぞれ構築した (図2参照)。これらの発現ベクターを、文献 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6987-6991, 1988) の記載に従ってGene-Pulser (Bio-Rad) を用いてBCGに形質導入し、20  $\mu$ g/mlのカナマイシン含有のMiddlebrook 7H10寒天 (Difco) 平板上で形質転換体を選択した。その結果、pS0-p24WTおよびpS0-p24Muをそれぞれ含む組換えクローンrBCG-p24WTおよびrBCG-p24Muを得た。

#### 1.4. ウェスタンブロット分析

rBCGを、7H10-ADCブロス中で2週間増殖させた。培地の一部を定期的に収集し、超音波処理し、Multi Gel 4/20 (Daichi Chemical Co. Ltd.、日本) を用い

てドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル (SDS-PAGE) 電気泳動に供した。分画したタンパク質をニトロセルロースフィルター上にエレクトロブロットし、V10モノクローナル抗体 (J. Gen. Virol. 73:2445-2450, 1992) と反応させ、ペルオキシダーゼの基質 (3,3'-ジアミノベンジジン) を用いて可視化した。

#### 1.5. Gag p24抗原量の測定

HIV-1 p24 Antigen ELISA Test System (Coulter Corp. 米国、フロリダ州、Ortho Diagnostic Systems Inc.、米国、ニュージャージー州) を用いて、rBCGの溶解産物中のp24抗原濃度を測定した。

#### 1.5. モルモットにおける遅延型過敏症 (DTH) 反応

Hartley系雌モルモット (体重約350g) に、rBCG (0.1-5mg/0.1ml生理食塩水) を皮下投与して免疫した (n=3)。DTH皮膚反応を調べるため、100 $\mu$ lの生理食塩水あたり0.1 $\mu$ gの精製ツベルクリンタンパク質誘導体 (PPD)、10 $\mu$ gまたは1 $\mu$ gの組換えHIV-HXB3 Gagタンパク質 (NIH AIDS Research & Reference Program, Rockville, メリーランド州、ロックビル) を、rBCG免疫化モルモットに各々皮内注射した。ネガティブコントロールには生理食塩水を用いた。24時間後、皮膚反応を測定した。

#### 1.6. マウスにおけるリンパ球増殖の検定

8週齢の雌BALB/cマウス (n=3) を、rBCG (0.01mg) の皮下投与によって免疫し、接種後9週で屠殺し、脾臓を摘出した。脾臓細胞は $2 \times 10^6$ 細胞/mlに調整し、完全培地 (RPM1640-10%ウシ胎児血清、 $5.5 \times 10^{-5}$  M 2-メルカプトエタノール、50 U/mlペニシリン、50 $\mu$ gストレプトマイシン) またはHIV-HXB2 Gag重複ペプチドを50 $\mu$ l/ml濃度で含む完全培地と混合し、培地または25 $\mu$ g/mlのペプチド含有培地の細胞終濃度を $1 \times 10^6$ 細胞/mlとした。使用した重複ペプチドは、Gag p24領域をカバーするp11 (LERFAVNPGLLTSE: 配列番号4) からP35 (NIQQQMVFHQAI SPRT: 配列番号5) までである。細胞 (100 $\mu$ l) は、丸底96穴マイクロタイタープレートに3重に添加し、37℃、5% CO<sub>2</sub>、加湿した環境下で2日間にわたりインキュベートした。回収の6時間前、1 $\mu$ Ciの [<sup>3</sup>H]-チミジンを添加し、次いで液体シンチレーションカウンターによりカウントした。

#### 1.7. Balb/cマウスにおける抗体産生

8週齢の雌BALB/cマウス (n=3) を、rBCG (0.05mg) の皮下投与によって免疫し、25日後に血清を収集し、使用まで-80℃で貯蔵した。血清中の抗原特異抗体の力価は、文献 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:10693-10697, 1995) の記載に従い、酵素免疫アッセイ (ELISA) により測定した。Maxisorbプレート (Nunc) は、重炭酸緩衝液 (pH9.6) 中でウェルあたり0.2 $\mu$ gの組換えHIV-HXB2 Gagタンパク質を用い、4℃にて一晩コートした。2% (w/v) ウシ血清アルブミン (BSA) を用いて、37℃で2時間にわたってウェルをブロックした後、リン酸緩衝液 (PBS) -0.1% Tween20-0.1% BSA中の血清希釈物を、ウェルに対し37℃で2時間添加した。3回の洗浄の後、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を結合したヤギ抗マウスIgG (ZYMED、米国、カリフォルニア州) を、37℃で2時間にわたってウェルに添加し、プレートを洗浄し、次いでTMB (MOSS、米国、メリーランド州) を基質として可視化した。室温における30分間のインキュベーションの後、ELISAリーダーを用いて470nmの吸光度を測定した。抗原特異IgG抗体についての終点の力価は、最終値のlog2の逆数として算出した。すべての価は、正常マウス血清の吸光度に関してバックグラウンド修正した。

## 2. 結果

### 2.1. HIV-1 Gag p24抗原発現ベクターの構築

合成した改変型p24遺伝子を、図1に示したように設計した。コード領域の全G+C含有量は67.4%であり、pNL432由来の野性型p24遺伝子の43.4%よりも高い。これらの二つの遺伝子はpUC-hspKベクターにクローニングし、hsp60プロモーターの支配下で、BCGの細胞質において発現された。液体培地中における14日間の培養の後、rBCG-p24WTおよびrBCG-p24Muの溶解産物についてウェスタンブロット分析調査を行なった。その結果は図3に示したとおりである。rBCG-p24MuはrBCG-p24WTよりも明らかに高いp24抗原の発現を示した。

### 2.2. 増殖速度およびrBCGにおけるp24抗原の発現レベルの比較

p24の発現レベルを比較するため、培養細胞の少量を定期的に回収し、rBCG増殖の時間経過 (図4A) およびp24抗原濃度 (図4B) を調べた。

【0028】

rBCG-p24WTは正常な増殖曲線を描いたのに対し、rBCG-p24Muは9日以降に増殖

抑制を示した。増殖の抑制に一致して、p24抗原の発現はrBCG-p24MuではrBCG-p24WTよりも20倍以上のレベルまで著しく上昇し（表2）た。双方の発現ベクターのp24コード領域以外の配列は同じであるため、この発現レベルの上昇はコドン変異を原因とするものであることは明らかである。

【0029】

【表2】

**Table 1. Measurement of p24 concentration in lysates of recombinant BCG clones**

Vector	p24 amount (mg/l) <sup>a</sup>
pSO246 (no insert)	0
pSO-p24WT (native)	0.082
pSO-p24Mu (mycobacteria)	2.1

<sup>a</sup> rBCG was cultured in 7H9-ADC broth for 16 days. One ml of each culture was sonicated and assayed by p24 ELISA kit.

【0030】

### 2.3. モルモットにおけるDTH反応

免疫応答に対する改変型p24の発現の効果を評価するため、まずモルモットにおけるDTH皮膚反応を調べた。以前の報告（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:10693-10697, 1995）では、V3エピトープに特異的なDTH反応を検出するためには、5mgのを注射することが必要であった。一方、改変型p24を産生するrBCG-p24Muを用いた場合には、表2に示したように、0.1mg量の注射によって、5mgのrBCG-V3J1注射の場合と同様のp24に対する著しいDTH反応を検出することができた。なお、rBCG-p24MuおよびrBCG-p24WTでそれぞれ免疫化されたモルモットの間には、何ら異なる反応性は観察されなかった。

【0031】

【表 3】

Table 2. Sensitivity of HIV-1 Gag antigen-specific DTH induction in rBCG-p24s-immunized guinea pig.

Immunization	Against PBS	Against PPD	Against Gag antigen	
		0.1 $\mu$ g	1 $\mu$ g	10 $\mu$ g
<b>rBCG-p24WT</b>				
0.1 mg/s.c.	0	15.0	0	<u>10.0</u>
<b>rBCG-p24Mu</b>				
0.1 mg/s.c.	0	14.5	0	<u>10.0</u>
5 mg/s.c.	0	14.5	0	<u>10.0</u>
<b>rBCG-pSO246</b>				
0.1 mg/s.c.	0	15.0	0	0

Mean diameter (mm) of skin reaction in rBCGs immunized animals

## 【0032】

## 2.4. マウスにおけるGag p24に特異的なリンパ球の増殖

p24の発現レベルの効果を査定するため、Balb/cマウスにおけるリンパ球の増殖を調べた。その結果、0.01mgのrBCG-p24WTで免疫化したマウスではp24ペプチドに特異的なリンパ球の有意な増殖は全く検出できなかったが、rBCG-p24Muで免疫化されたマウスでは有意な活性（刺激指数は4.04）がp16～20ペプチドに対して観察された（図5）。

## 2.5. マウスにおけるp24抗原に対する抗体の応答

体液性免疫応答について、0.05mgのrBCG-p24WTおよびrBCG-p24Muでそれぞれ免疫化したマウスについて、抗p24抗体の産生を比較した。p24抗原-ELISAによる血清の抗体力価は図6に示したとおりである。rBCG-p24Muで免疫化したマウスは、rBCG-p24WT免疫化マウスよりも約2倍高い抗体力価を示した。

## 【0033】

## 【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、抗原性タンパク質の発現量に優れ、その結果として通常のBCGワクチンと同程度の使用量によっても、

標的とする感染症や癌等に対して十分な免疫応答を誘導することのできる組換え BCG ワクチンが提供される。

【0034】

【配列表】

<110> Japan Science and Technology Corporation, and  
Director-General, National Institute of Infectious Diseases

<120> A recombinant BCG vaccine

<130> NP01538-YS

<140>

<141>

<160> 5

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 1

aatggatcct atagtgcaga acctc

25

<210> 2

<211> 31



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 2

aatgggccct tacaaaactc ttgctttatg g

31

<210> 3

<211> 706

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (5)..(700)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 3

ggat ccg atc gtc cag aac ctg cag ggc cag atg gtc cac cag gcc atc 49

Pro Ile Val Gln Asn Leu Gln Gly Gln Met Val His Gln Ala Ile

1

5

10

15

tcg ccg cgc acc ctg aac gcc tgg gtc aag gtc gtc gag gag aag gcc 97

Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu Glu Lys Ala

20

25

30

ttc tcg ccg gag gtc atc ccg atg ttc tcg gcc ctg tcg gag ggc gcc 145

Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu Gly Ala

35

40

45

acc ccg cag gac ctg aac acc atg ctg aac acc gtc ggc ggc cac cag 193

Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His Gln

50

55

60

gcc gcc atg cag atg ctg aag gag acc atc aac gag gag gcc gcc gag 241

Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu

65

70

75

tgg gac cgc ctg cac ccg gtc cac gcc ggc ccc atc gca ccg ggc cag 289

Trp Asp Arg Leu His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala Pro Gly Gln

80

85

90

95

atg cgc gag cct cgc ggc tcg gac atc gcc ggc acc acc tcg acc ctc 337

Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Leu

100

105

110

cag gag cag atc ggc tgg atg acc cac aac ccg ccg atc ccg gtc ggc 385

Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr His Asn Pro Pro Ile Pro Val Gly

115

120

125

gag atc tac aag cgc tgg atc atc ctg ggc ctg aac aag atc gtc cgc 433

Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg

130

135

140

atg tac tcg ccg acc tcg atc ctg gac atc cgc cag ggt ccg aag gag 481

Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu

145

150

155

ccg ttc cgc gac tac gtc gac cgc ttc tac aag acc ctc cgc gcc gag 529

Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu

160

165

170

175

cag gcg tcg cag gag gtc aag aac tgg atg acc gag acc ctg ctg gtc 577

Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val

180

185

190

cag aac gcc aac ccg gac tgc aag acc atc ctg aag gcc ctg ggt ccg 625

Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro

195

200

205

ggc gcc acc ctg gag gag atg atg acc gcc tgc cag ggc gtc ggc ggc 673

Gly Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly

210

215

220

ccg ggc cac aag gcg cgc gtc ctg taa gggccc

706

Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu

225

230

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial Sequence: Synthetic oligopeptide

<400> 4

Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu

1

5

10

15

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial Sequence: Synthetic oligopeptide

<400> 5

Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr

1

5

10

15

【図面の簡単な説明】

【図 1】

マイコバクテリアの最適コドンをもつ合成HIV-1 gag p24遺伝子のヌクレオチドおよびアミノ酸配列である。pUC-hspKベクターへのクローニングのため、このDNAフラグメントの5'および3'末端にBamHIおよびApaI認識部位を付加した。

【図 2】

発現ベクターpS0-p24MuおよびpS0-p24WTの構造を示した模式図である。灰色の三角形および円形は、各々hsp60プロモーターおよびターミネーターの転写方向を示している。白色、黒色、および点つきのバーは、各々マイコバクテリアのDNAフラグメント、改変型p24遺伝子、および野生型p24遺伝子のPCRフラグメントを示す。Ori-MおよびKmは、各々マイコバクテリアの複製起点およびカナマイシン耐性遺伝子を示す。

### 【図 3】

rBCG-p24WTおよびrBCG-p24Muの溶解産物についてのウェスタンブロット分析の結果である。抗p24モノクローナル抗体V10と反応するタンパク質を可視化した。レーン1はpS0246を含むrBCGの溶解産物（ネガティブコントロール）、レーン2はrBCG-p24Nの溶解産物、レーン3はrBCG-p24Mの溶解産物である。分子サイズのマーカー（Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range, Bio-Rad Co. Ltd.）は以下のとおりである：リゾチーム（20.7kDa）、ダイズトリプシンインヒビター（28.8kDa）、炭酸脱水酵素（34.4kDa）、オボアルブミン（50.0kDa）、ウシ血清アルブミン（77.0kDa）、およびホスホリラーゼB（103kDa）。

### 【図 4】

rBCG-p24WTおよびrBCG-p24Muの増殖速度およびp24発現レベルを比較した結果である。(A) 1mlの各培養物を定期的に回収し、610nmにおけるO.D.を測定し、プロットした。(B)定期的に1mlの各培養物からrBCG細胞を回収し、超音波処理し、HIV-1 p24 Antigen ELISA Test Systemによりp24濃度を測定し、培養期間に対して測定値をプロットした。

### 【図 5】

rBCG-p24WTおよびrBCG-p24Muで免疫化したマウスにおける、Gag p24重複ペプチド刺激後のリンパ球増殖を測定した結果である。

### 【図 6】

rBCG-p24 WTおよびrBCG-p24Muで免疫化したマウスにおける抗Gag p24抗体の力を測定した結果である。

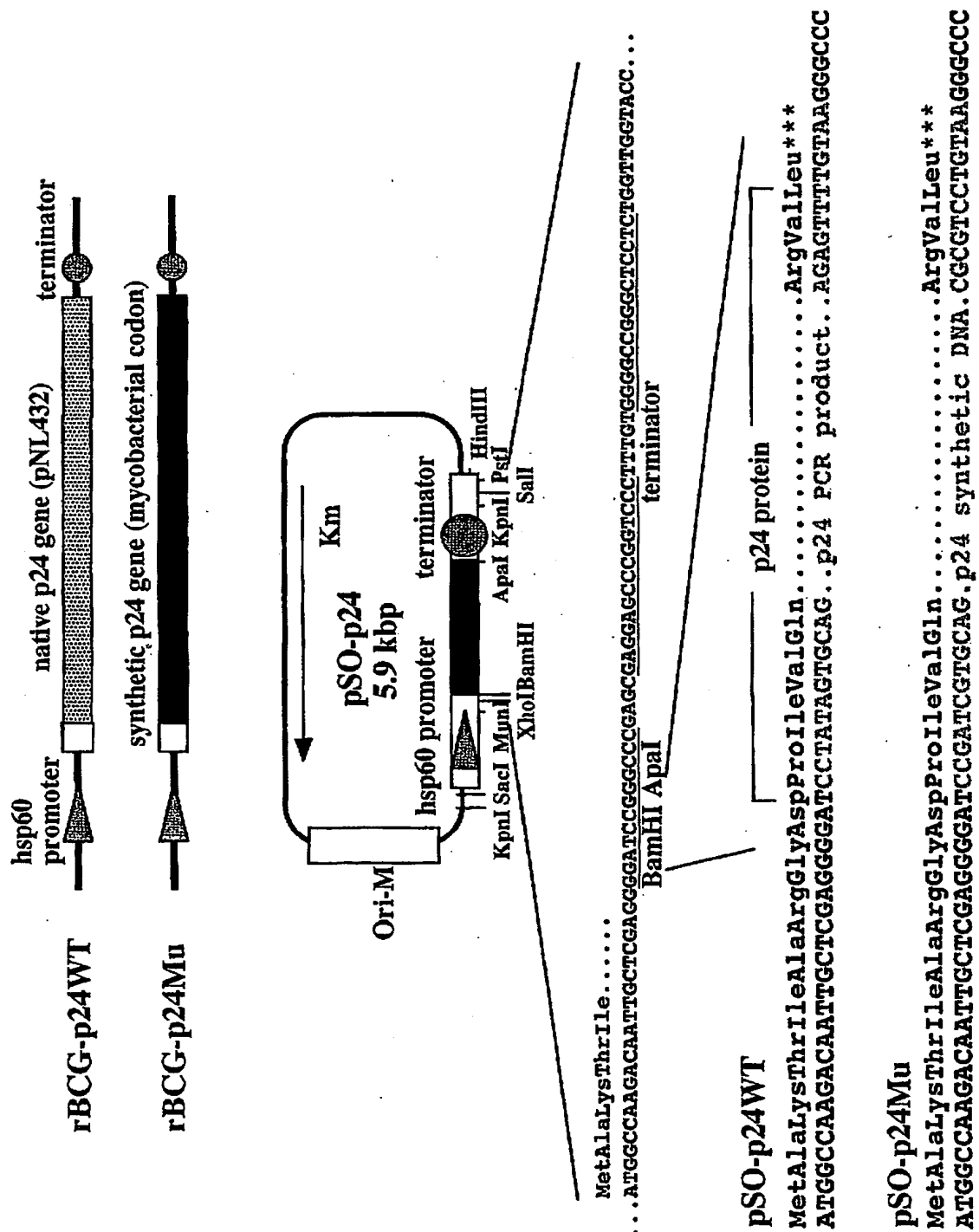
【書類名】

図面

【図1】

10 20 30 40 50 60  
ggatccgcatcgctccagaacctgcagggccagatgggtccaccaggccatctcgccgcgcac  
BamHI P I V Q N L Q G Q M V H Q A I S P R T  
70 80 90 100 110 120  
cctgaacgcctgggtcaaggctcgctcaggagaaggccttctcgccggagggtcatcccgat  
L N A W V K V V E E K A F S P E V I P M  
130 140 150 160 170 180  
gttctcgccctgtcggaggggcgccaccccgagacgtgaacaccatgctgaacaccgt  
F S A L S E G A T P Q D L N T M L N T V  
190 200 210 220 230 240  
cggcgccaccaggccgcatgcagatgctgaaggagaccatcaacgaggaggccgcca  
G G H Q A A M Q M L K E T I N E E A A E  
250 260 270 280 290 300  
gtgggaccgcctgcacccgggtccacgcggcccccacgcacccggccagatgcgcgagcc  
W D R L H P V H A G P I A P G Q M R E P  
310 320 330 340 350 360  
tcgcggctcggacatcgccggcaccacctcgacctccaggagcagatcggtggatgac  
R G S D I A G T T S T L Q E Q I G W M T  
370 380 390 400 410 420  
ccacaaccgcgcatcccggtcggcgagatctacaagcgctggatcatcctgggcctgaa  
H N P P I P V G E I Y K R W I I L G L N  
430 440 450 460 470 480  
caagatcgctccgcatgtactcgccgacctcgatcctggacatccgccagggtccgaagga  
K I V R M Y S P T S I L D I R Q G P K E  
490 500 510 520 530 540  
gccgttcgcgactacgtcgaccgcttctacaagaccctccgcgccgagcaggcgtcgca  
P F R D Y V D R F Y K T L R A E Q A S Q  
550 560 570 580 590 600  
ggagggtcaagaactggatgaccgagaccctgctgggtccagaacgcccaaccggactgcaa  
E V K N W M T E T L L V Q N A N P D C K  
610 620 630 640 650 660  
gaccatcctgaaggccctgggtccggggcgccaccctggaggagatgatgaccgcctgcc  
T I L K A L G P G A T L E E M M T A C Q  
670 680 690 700 710  
gggcgtcggcgccggccggaagggcgcgctcctgtaagggcc  
G V G G P G H K A R V L \*  
ApaI

【図 2】



【図 3】

1 2 3

(kDa)

— 103  
— 77

— 50

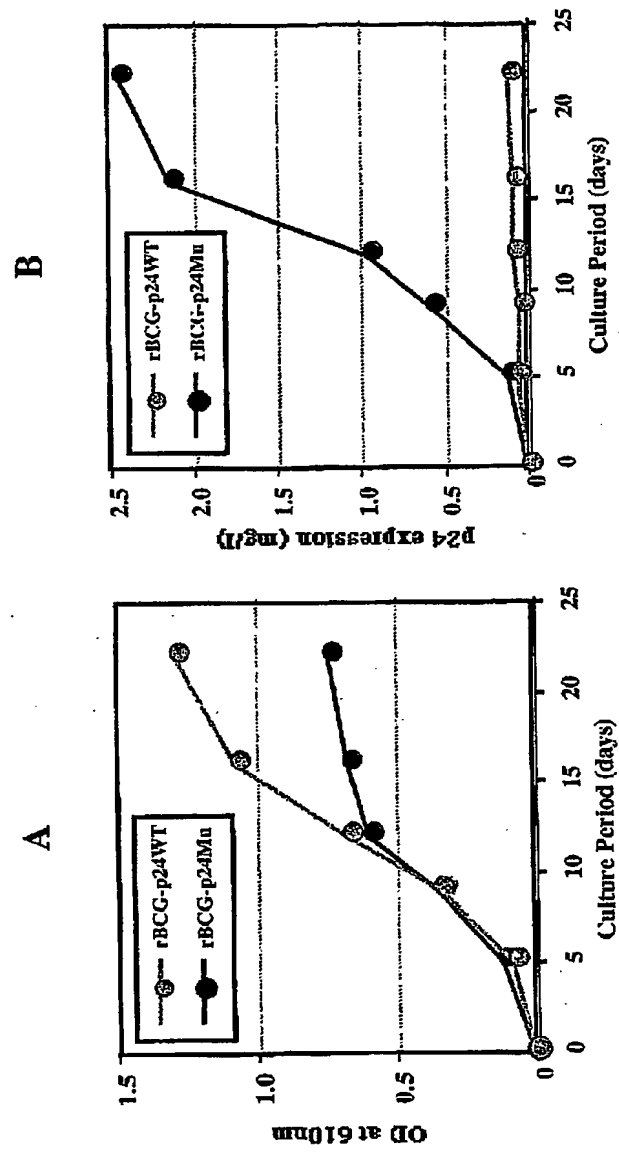
— 34.3

— 28.8

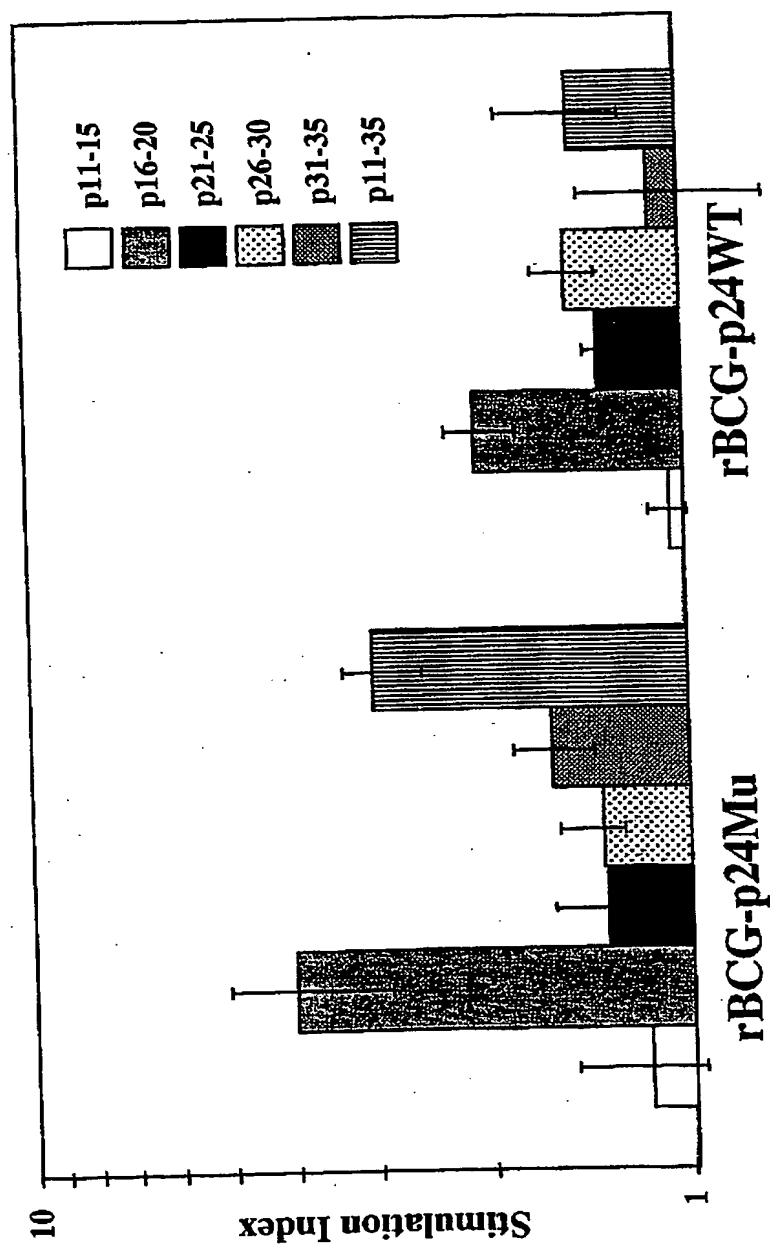
— 20.7



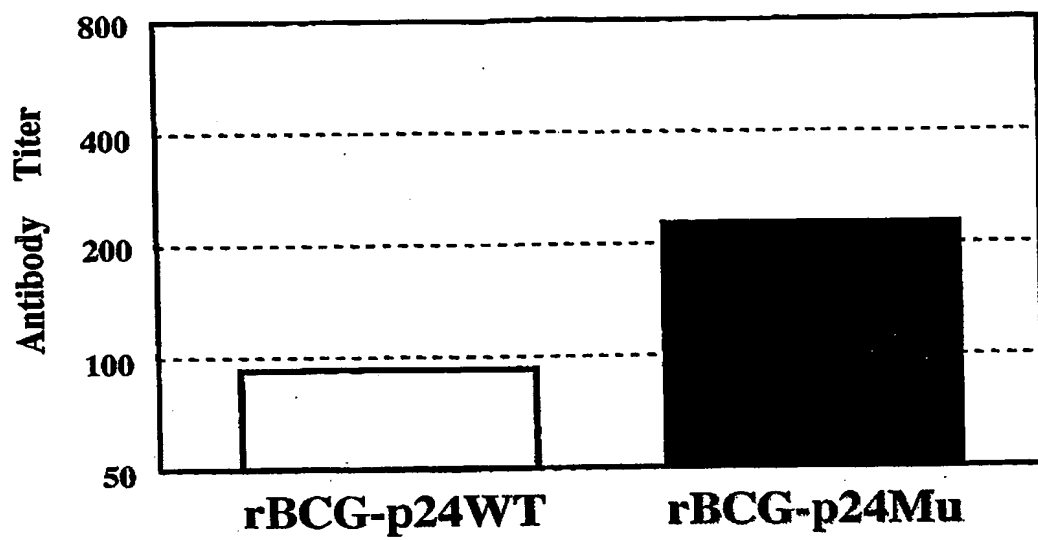
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 抗原性タンパク質の発現量に優れ、その結果として通常のBCGワクチンと同程度の使用量によっても、標的とする感染症や癌等に対して十分な免疫応答を誘導することのできる組換えBCGワクチンを提供する。

【解決手段】 外来性の抗原性タンパク質をコードするポリヌクレオチドを保有する発現ベクターによって形質転換された組換えBCGワクチンであって、ポリヌクレオチドが、各コドンの第3番目塩基がアミノ酸の種類を変化させることなくGまたはCに置換された改変型ポリヌクレオチドである。

【選択図】 なし

特願 2002-237610

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団

特願2002-237610

出願人履歴情報

識別番号

[591222245]

1. 変更年月日

1997年 6月12日

[変更理由]

名称変更

住 所

東京都新宿区戸山一丁目23番1号

氏 名

国立感染症研究所長